



中华人民共和国国家标准

GB/T 16550—2020
代替 GB/T 16550—2008

新城疫诊断技术

Diagnostic techniques for newcastle disease

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 16550—2008《新城疫诊断技术》，与 GB/T 16550—2008 相比，主要技术变化如下：

- 修改了血凝和血凝抑制试验判定结果(见 7.3 和 7.4, 2008 年版的 5.3 和 6.3)；
- 删除了毒力评价指标中 MDT 和 IVPI(见 2008 年版的 4.3 和 4.4)；
- 增加了实时荧光 RT-PCR 检测方法(见第 9 章)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：中国动物卫生与流行病学中心、扬州大学。

本标准主要起草人：刘华雷、王静静、于晓慧、吕艳、吴艳涛、胡顺林、郑东霞、赵云玲、刘文博、刘秀梵、王志亮。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 16550—1996、GB/T 16550—2008。



引 言

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)强毒株感染禽类引起的一种急性、烈性传染病,给世界养禽业造成巨大的经济损失。世界动物卫生组织(OIE)将新城疫列为法定报告的动物疫病,我国农业农村部将其列为一类动物疫病。

新城疫病毒可感染 240 多种禽类,其中家鸡和珠鸡最易感,感染禽(野鸟)及带毒禽(野鸟)系主要的传染源。新城疫病毒主要经消化道和呼吸道传播,被污染的水、饲料、蛋托(箱)、种蛋、鸡胚和带毒的野生飞禽、昆虫及有关人员等均可成为传播媒介。

新城疫病毒属于副黏病毒科(Paramyxoviridae)、正禽腮腺炎病毒属(Orthoavulavirus),目前新城疫病毒只有一种血清型,但可分为多种基因型。OIE 规定,新城疫是由新城疫病毒强毒株引起的禽类感染,因此,对于新城疫的诊断,除了鉴定新城疫病毒之外,还需要对其致病性进行评估。对于致病性评估的方法,可通过 1 日龄 SPF 鸡 ICPI 进行测定,也可通过分子生物学技术,如 RT-PCR 结合序列测定等。根据新城疫病毒 F 基因部分序列(47 nt~420 nt)差异,可将新城疫病毒分为 Class I 和 Class II 两大类,其中 Class I 在国内均系弱毒株,因此,针对 Class I NDV 的检测方法不具有诊断意义,本标准所涉及的诊断方法均针对 Class II 新城疫强毒株。



新城疫诊断技术

1 范围

本标准规定了新城疫的临床诊断、病毒分离与鉴定、血凝和血凝抑制试验、反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和实时荧光 RT-PCR(Real-time RT-PCR)的技术要求。

本标准适用于新城疫的诊断、检疫、检测、监测和流行病学调查等。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Ct 值:每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环次数(Cycle threshold)

DEPC:焦碳酸二乙酯(Diethy pyrocarbonate)

HA:血凝(Hemagglutinin)

HI:血凝抑制(Haemagglutination inhibition)

ICPI:脑内接种致病指数(Intracerebral pathogenicity index)

ND:新城疫(Newcastle disease)

NDV:新城疫病毒(Newcastle disease virus)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline)

RBC:鸡红细胞悬液(Red blood cell)

RNA:核糖核酸(Ribonucleic acid)

RT-PCR:反转录聚合酶链式反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

Real-time RT-PCR:实时荧光 RT-PCR(Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction)

SPF:无特定病原体(Specific pathogen free)

4 临床诊断

4.1 流行病学

4.1.1 宿主范围广,鸡、火鸡、鹌鹑、鸽、鹅等多种家禽及野禽均易感,鸭也可感染。

4.1.2 传染源主要为感染禽(野鸟)及带毒禽(野鸟),主要经消化道和呼吸道传播,被污染的水、饲料、蛋托(箱)、种蛋、鸡胚和带毒的野生飞禽、昆虫及有关人员等均可成为主要的传播媒介。

4.1.3 该病无明显季节性,一年四季均可发生,春秋季多发。

4.2 临床症状

4.2.1 临床致病型

根据临床表现不同,临床致病型分为:

- a) 嗜内脏速发型:以消化道出血性病变为主要特征,死亡率高;
- b) 嗜神经速发型:以呼吸道和神经症状为主要特征,死亡率高;
- c) 中发型:以呼吸道和神经症状为主要特征,死亡率低;
- d) 缓发型:以轻度或亚临床性呼吸道感染为主要特征;
- e) 无症状肠道型:以亚临床性肠道感染为主要特征。

4.2.2 典型症状

当病鸡出现下列之一或全部临床症状时,可作为初步诊断的依据之一:

- a) 发病急、病死率高;
- b) 体温升高、精神沉郁、呼吸困难、食欲下降;
- c) 粪便稀薄,呈黄绿色或黄白色;
- d) 发病后期出现扭颈、翅膀麻痹、瘫痪等神经症状;
- e) 免疫禽群出现产蛋下降,蛋壳质量变差,产畸形蛋或异色蛋。

4.3 剖检变化

当病鸡出现下列之一或全部剖检变化时,可作为初步诊断的依据之一:

- a) 全身黏膜和浆膜出血,以呼吸道和消化道最为严重,气管环状出血;
- b) 腺胃黏膜水肿,乳头和乳头间有出血点;
- c) 盲肠扁桃体肿大、出血、坏死;
- d) 十二指肠和直肠黏膜出血,泄殖腔黏膜出血,有的可见纤维素性坏死病变;
- e) 脑膜充血和出血;
- f) 鼻窦、喉头、气管黏膜充血,偶有出血,肺可见淤血和水肿。

4.4 鉴别诊断

家禽感染高致病性禽流感病毒后,临床表现和死亡率与新城疫(ND)类似。与 ND 相比,高致病性禽流感以全身器官出血为特征,包括:肿头,眼睑周围浮肿,鸡冠和肉垂肿胀、发紫、出血和坏死,腿及爪鳞片出血等。在临床实践中,很难依据临床症状和剖检变化进行区分,应依靠实验室诊断进行鉴别。

4.5 结果判定

当禽类符合 4.1,且符合 4.2、4.3 之一的,可判定为疑似新城疫。

5 样品采集与处理

5.1 总则

样品采集宜在发病初期、选择具有典型临床症状的家禽,可采集脑、肺脏、脾脏、肾、肠(包括内容物)、肝和心脏等组织脏器,也可采集未见明显临床症状禽类的泄殖腔和口咽拭子样品进行实验室诊断。采样过程中不得交叉污染,在田间采样应勤换一次性手套,每采集一个样品宜更换或消毒一次灭菌采样

器具,尽量做到无菌采集。样品采集、处理、保存和运输应符合 GB 19489 和 NY/T 541 的要求。

5.2 组织样品采集

典型临床发病禽可无菌采集脑、肺、脾、肾、肠(包括内容物)、气管、肝、心等组织脏器,装入无菌采样袋或其他灭菌容器并编号,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

5.3 拭子样品采集

采集活禽样品时可采集口咽和泄殖腔拭子。取口咽拭子时应将拭子深入喉头及上腭裂来回旋转2次~3次,要求可见明显黏液。采集泄殖腔拭子时应将拭子深入泄殖腔旋转一圈并沾取少量粪便。对于鸽、珍禽等体型较小的禽鸟,采样时需用适合的拭子,避免因拭子取样给禽类造成损伤。将采集后的拭子放入盛有2.0 mL的PBS(0.01 mol/L、pH 7.0~7.4,含青霉素2 000 U/mL、链霉素2 mg/mL、10%甘油)的采样管中,编号。用于病毒分离的拭子样品于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存,尽量避免反复冻融。

5.4 血清样品采集

无菌采集禽类的血液,每只2.0 mL,用于新城疫抗体检测。无菌分离血清,装入2.0 mL离心管中,加盖密封后冷藏或冷冻保存。

5.5 样品运输

样品采集后置保温箱中,加入预冷的冰袋,密封,宜24 h内送实验室。

5.6 样品处理

5.6.1 生物安全措施

样品处理的生物安全措施按照 GB 19489 和 NY/T 1948 进行。

5.6.2 组织样品处理

用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品,置组织匀浆器充分研磨,置于含抗生素的PBS(0.01 mol/L、pH 7.0~7.4)中,制成浓度为10%~20%的悬浮液,冻融2次~3次,室温($20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)静置1 h~2 h,3 000 r/min离心5 min,取上清液转入无菌的1.5 mL离心管中,编号备用。

5.6.3 拭子样品处理

将采集的拭子样品在振荡器上充分混合后,将拭子中的液体充分挤压后弃去拭子,室温静置作用30 min,3 000 r/min离心5 min,取上清液转入无菌的1.5 mL离心管中,编号备用。

5.6.4 样品保存

处理好的样品在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存应不超过24 h。若需长期保存,应放置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,反复冻融不超过3次。

6 病毒分离与鉴定

6.1 主要仪器设备

6.1.1 孵化器。

6.1.2 冰箱($2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 不同温度)。

6.1.3 台式高速冷冻离心机(最大离心力 12 000 g 以上)。

6.1.4 微量可调移液器(10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

6.1.5 1.0 mL 注射器(灭菌)。

6.1.6 II 级生物安全柜。

6.2 试剂

6.2.1 0.01 mol/L pH 7.2 PBS, 见附录 A。

6.2.2 1% 鸡红细胞悬液(RBC), 见附录 B。

6.3 操作程序

6.3.1 鸡胚接种

用 1.0 mL 注射器吸取上清液, 按 0.2 mL/枚的剂量经尿囊腔接种 9 日龄~11 日龄的 SPF 鸡胚, 每个样品至少接种 5 枚。接种后, 37 $^{\circ}\text{C}$ ~38 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育。18 h 后每 12 h 照胚, 观察鸡胚死亡情况。

6.3.2 病毒收获

收集 18 h 以后的死胚及 96 h 仍存活鸡胚, 置 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 、4 h 或过夜, 无菌收取鸡胚尿囊液。

6.3.3 病毒鉴定

6.3.3.1 血凝(HA)试验: 收获感染鸡胚尿囊液, 测定其血凝活性。如果没有血凝活性或血凝效价 $\leq 3\log_2$, 则用初代分离的尿囊液于 SPF 鸡胚继续盲传两代, 若仍为阴性, 则认为新城疫病毒分离阴性。试验方法按 7.3 执行。

6.3.3.2 血凝抑制(HI)试验: 对于 HA 效价高于或等于 $4\log_2$ 的尿囊液, 应采用新城疫病毒标准阳性血清进行血凝抑制试验以确认是否含有新城疫病毒。试验方法按 7.4 执行。

6.3.4 毒力测定

6.3.4.1 测定方法

经确定仅为新城疫病毒的情况下, 应根据 1 日龄 SPF 鸡脑内接种致病指数(ICPI)测定病毒毒力。

6.3.4.2 操作程序

6.3.4.2.1 HA 效价高于或等于 $4\log_2$ 的新鲜感染尿囊液(不超过 24 h~48 h, 细菌检验为阴性), 用无菌等渗盐水作 10 倍稀释。

6.3.4.2.2 脑内接种出壳后 24 h~40 h 之间的 SPF 雏鸡, 共接种 10 只, 每只接种 0.05 mL。

6.3.4.2.3 每 24 h 观察一次, 共观察 8 d。

6.3.4.2.4 每天观察应给鸡打分, 正常鸡记作 0, 病鸡记作 1, 死鸡记作 2(每只死鸡在其死后的每日观察中仍记作 2)。

6.3.4.2.5 ICPI 是每只鸡 8 d 内所有观察数值的平均数, 计算方法见公式(1)。

$$\text{ICPI} = \frac{\sum_s \times 1 + \sum_d \times 2}{T} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$\sum_s$ ——8 d 累计发病数;

$\sum_d$ ——8 d 累计死亡数;

T ——8 d 累计观察鸡的总数。

6.3.4.3 结果判定

6.3.4.3.1 ICPI 值越大,NDV 致病性越强,最强毒力病毒的 ICPI 接近 2.0,而弱毒株的 ICPI 值为 0。

6.3.4.3.2 $\text{ICPI} \geq 0.7$,可判为阳性。

7 血凝试验和血凝抑制试验

7.1 主要仪器设备

7.1.1 微型振荡器。

7.1.2 微量可调移液器(10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

7.1.3 96 孔 V 型血凝板。

7.2 试剂

7.2.1 PBS;见附录 A。

7.2.2 1%鸡红细胞悬液(RBC);见附录 B。

7.2.3 新城疫病毒标准阳性抗原,新城疫病毒标准阳性血清、阴性血清。

7.3 血凝试验

7.3.1 在 96 孔 V 型微量血凝板 1 孔~12 孔均加入 25 μL PBS。

7.3.2 在第 1 孔中加入 25 μL 抗原或病毒悬液,吹打 3 次~5 次,充分混匀。

7.3.3 将抗原或病毒悬液在反应板上进行系列倍比稀释,即从第 1 孔中吸取 25 μL 悬液至第 2 孔,混匀后再吸取 25 μL 悬液至第 3 孔,依次进行倍比稀释到第 11 孔,最后从第 11 孔吸取 25 μL 弃去,第 12 孔不加抗原或病毒悬液,作为 PBS 对照。

7.3.4 每孔加入 25 μL PBS。

7.3.5 每孔加入 25 μL 体积分数为 1%的鸡红细胞悬液(将鸡红细胞悬液充分摇匀后加入)。将微量反应板在微型振荡器振荡混匀或轻扣反应板混匀反应物,室温静置 20 min~30 min 或 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 静置 60 min,当对照孔(第 12 孔)红细胞呈显著纽扣状时判定结果。

7.3.6 结果判定:将反应板倾斜,观察红细胞有无泪珠状流淌。以完全凝集(不流淌)的最高稀释倍数为抗原或病毒悬液的血凝效价。完全凝集的病毒的最高稀释倍数为 1 个血凝单位(HAU)。

7.4 血凝抑制试验

7.4.1 根据测得抗原或病毒悬液血凝效价配制 4 单位抗原(4HAU)。4HAU 的配制方法如下:假设抗原的血凝效价为 $8\log_2(1:256)$,则 4 HAU 抗原的稀释倍数应是 1:64(256 除以 4),稀释时,将 1 mL 抗原加入 63 mL PBS 中即为 4 HAU 抗原。

7.4.2 4 HAU 检测:4 单位抗原应现用现配,在使用前进行标定。将配制的 4 HAU 进行系列稀释,使最终稀释度分别为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 和 1:7,然后按照 7.3 进行血凝试验。如果配制的抗原液为 4 HAU,则 1:4 稀释度将给出凝集终点;如果 4 HAU 高于 4 个单位,可能 1:5 或 1:6 为终点;如果较低,可能 1:2 或 1:3 为终点。应根据检验结果将抗原稀释度做适当调整,使工作液确为 4 HAU。

7.4.3 取 96 孔 V 型微量血凝板,用移液器在第 1 孔~第 11 孔各加入 25 μL PBS,第 12 孔加入 50 μL PBS。

7.4.4 在第 1 孔加入 25 μL 血清,充分混匀后移出 25 μL 至第 2 孔,依次类推,倍比稀释至第 10 孔,并从第 10 孔弃除 25 μL 。

7.4.5 在第1孔~第11孔各加入25 μL 4 HAU 抗原,振荡15 s,使液体混合均匀,室温静置至少20 min或2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 至少60 min。

7.4.6 在第1孔~第12孔每孔加入25 μL 1%的鸡红细胞悬液,振荡混匀,室温静置20 min~40 min或2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 静置40 min~60 min,对照孔红细胞呈显著纽扣状时判定结果。

7.4.7 第11孔为抗原对照,第12孔为PBS对照,每次测定还应设已知效价的标准阳性血清和阴性血清作对照。

7.4.8 结果判定:将反应板倾斜,从背侧观察加样孔底部的红细胞是否呈泪痕状流淌。以完全抑制4 HAU抗原的最高血清稀释倍数为该血清的HI抗体效价。只有当阴性血清对照孔血清效价 $\leq 2\log 2$,阳性血清对照孔血清效价与标定效价相差 ≤ 1 个滴度,红细胞对照无自凝现象时,试验结果有效。HI效价 $\leq 3\log 2$,判为HI试验阴性;HI效价 $\geq 4\log 2$ 判为HI试验阳性。

8 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

8.1 主要仪器设备

8.1.1 PCR扩增仪。

8.1.2 台式高速冷冻离心机:最大离心力12 000 g 以上。

8.1.3 II级生物安全柜。

8.1.4 微量可调移液器(2 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格),及其配套的无核酸酶处理的离心管与吸头。

8.1.5 电泳仪。

8.1.6 电泳槽。

8.1.7 紫外凝胶成像仪。

8.2 试剂

8.2.1 RNA提取试剂Trizol。也可用商品化RNA提取试剂盒,或其他等效RNA提取试剂和方法,如自动化核酸提取仪和其他配套核酸抽提试剂进行核酸提取。

8.2.2 三氯甲烷(氯仿)。

8.2.3 异丙醇(分析纯)。

8.2.4 75%乙醇:用新开启的无水乙醇(分析纯)和DEPC处理水按3:1配制而成,-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷。

8.2.5 RT-PCR相关试剂:可选择商品化试剂盒。

8.2.6 阳性对照:灭活的新城疫强毒感染鸡胚尿囊液。

8.2.7 阴性对照:SPF鸡胚尿囊液。

8.3 操作程序

8.3.1 样品准备

取处理后的拭子样品、组织样品或尿囊液3 000 r/min离心5 min,取200 μL 离心后的上清提取RNA。

8.3.2 病毒RNA提取

RNA提取应保证无细菌及核酸污染,实验材料和容器应经过消毒处理并一次性使用。提取RNA时应避免RNA酶污染。用Trizol提取核酸RNA的操作步骤如下:

a) 在无RNA酶的1.5 mL离心管中加入200 μL 检测样品,然后加入1 mL Trizol,振荡20 s,室

温静置 10 min。

- b) 加入 200 μL 三氯甲烷(氯仿),颠倒混匀,室温静置 10 min,12 000 r/min 离心 15 min。
- c) 管内液体分为三层,取 500 μL 上清液于离心管中,加入 500 μL 预冷($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)的异丙醇,颠倒混匀,静置 10 min。12 000 r/min 离心 15 min 沉淀 RNA,弃去所有液体(离心管在吸水纸上控干)。
- d) 加入 700 μL 预冷($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)的 75%乙醇洗涤,颠倒混匀 2 次~3 次。12 000 r/min 离心 10 min。
- e) 调水浴至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。离心管在室温下干燥至没有水滴。加入 40 μL DEPC 处理水, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中作用 10 min,充分溶解 RNA, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存或立即使用。

8.3.3 配置 RT-PCR 反应体系

8.3.3.1 引物

引物针对新城疫病毒 F 基因设计,上游引物 P1 的序列为 $5'\text{-ATGGGCYCCAGAYCTTCTAC-3'}$,下游引物 P2 的序列为 $5'\text{-CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC-3'}$,Y 为兼并碱基(Y: C/T)。

8.3.3.2 RT-PCR 反应体系配置

RT-PCR 反应体系配置见表 1。体系配好后盖紧 PCR 反应管盖,并做好标记。

表 1 RT-PCR 反应体系配置表

组分	体积 μL
无 RNA 酶灭菌超纯水	14.6
10 $\times$ 反应缓冲液	2.5
dNTPs	2
RNase 抑制剂(40 U/ μL)	0.5
AMV 反转录酶(5 U/ μL)	0.7
Taq 酶(5 U/ μL)	0.7
上游引物 P1(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
下游引物 P2(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
模板 RNA	3
合计	25

8.3.4 RT-PCR 反应

按 8.3.3.2 的加样顺序全部加完后,充分混匀,瞬时离心,使液体都沉降到 PCR 管底。同时设立阳性对照和阴性对照。按照下列程序进行扩增: $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,共进行 35 次循环;最后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min。最终的 RT-PCR 产物置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

8.3.5 扩增产物电泳检测

8.3.5.1 1.5%琼脂糖凝胶板的制备:称取 1.5 g 琼脂糖,加入 100 mL 1 $\times$ TAE 缓冲液中。加热融化后

加 5 μL (10 mg/mL) 溴乙锭, 混匀后倒入放置在水平面上的凝胶盘中, 胶板厚 5 mm 左右。依据样品数选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中形成加样孔), 放入电泳槽中, 加 $1\times\text{TAE}$ 缓冲液淹没胶面。

8.3.5.2 加样: 取 5 μL PCR 产物与 0.5 μL $10\times$ 加样缓冲液混匀后加入琼脂糖凝胶板的一个加样孔中。每次电泳同时设标准 DNA Marker、阴性对照、阳性对照。

8.3.5.3 电泳: 接通电源, 120 V 恒压电泳 30 min~40 min。

8.3.6 观察与记录

电泳结束后, 取出凝胶板置凝胶成像仪(或紫外线透射仪)上观察并记录结果。

8.4 结果判定

8.4.1 试验成立条件: 阳性对照出现 535 bp 左右扩增条带(参见附录 C), 同时阴性对照无扩增条带。

8.4.2 检测样品出现 535 bp 左右的目的片段(与阳性对照大小相符), 判为新城疫病毒核酸阳性; 检测样品未出现目的片段, 判为新城疫病毒核酸阴性。

8.5 NDV 强毒感染的确定

对扩增到的目的片段进行序列测定, 根据序列测定结果, 对毒株 F 基因编码的氨基酸序列进行分析。如果毒株 F2 蛋白的 C 端有“多个碱性氨基酸残基”, F1 蛋白的 N 端即 117 位为苯丙氨酸, 可确定为新城疫病毒强毒感染。“多个碱性氨基酸”是指毒株 F2 蛋白的 C 端在 113 位到 116 位残基之间至少有三个精氨酸或赖氨酸。

9 实时荧光 RT-PCR(Real-time RT-PCR)

9.1 主要仪器设备

9.1.1 荧光定量 PCR 仪。

9.1.2 其余器材同 8.1.2~8.1.4。

9.2 试剂

按 8.2 执行。

9.3 引物和探针

根据我国流行的所有基因型(基因 VI、VII、IX 和 XII 型)新城疫强毒 F 基因序列设计引物、探针。其中正向引物 NDV-IIa 序列为 5'-CTCAGACAGGGTCAATCATAGT-3', 反向引物 NDV-IIIb 序列为 5'-GCAAC-CCCAAGAGCTACA-3'。探针 NDV-IIp 序列为 5'-ATRAAGCGTTTGTGYCTCCTTCCTCC-3'。探针 5'端连接 FAM 荧光基团, 3'端连接 BHQ-1 淬灭基团, R、Y 为简并碱基(R: A/G; Y: C/T)。

9.4 操作程序

9.4.1 样品准备

按 8.3.1 执行。

9.4.2 病毒 RNA 的提取

按 8.3.2 执行。

9.4.3 实时荧光 RT-PCR 反应

9.4.3.1 按照表 2 配置实时荧光 RT-PCR 反应体系,盖紧盖子并做好标记。

表 2 实时荧光 RT-PCR 反应体系配置表

组分	体积 μL
DEPC 处理水	6
2×反应混合液	10
正向引物 NDV-Ⅱ a(20 μmol/L)	0.5
反向引物 NDV-Ⅱ b(20 μmol/L)	0.5
探针 NDV-Ⅱ p(10 μmol/L)	0.5
RT/Taq Mix	0.5
模板 RNA	2
合计	20

9.4.3.2 按 9.4.3.1 的加样顺序全部加完后,充分混匀,瞬时离心,使液体都沉降到 PCR 管底。同时设立阳性对照和阴性对照。将 PCR 管放在荧光定量 PCR 仪器上进行 RT-PCR 扩增,反应条件为:50 ℃ 反转录 30 min; 95 ℃ 预变性 3 min; 然后 94 ℃ 变性 15 s, 59 ℃ 退火 1 min, 共进行 45 次循环。每次循环在 59 ℃ 1 min 时搜集信号。

9.4.4 质控标准

9.4.4.1 阳性对照扩增曲线呈标准的 S 形曲线,且 Ct 值≤30(参见附录 D)。

9.4.4.2 阴性对照无 Ct 值,且无扩增曲线。

9.5 结果判定

9.5.1 样品无 Ct 值或 Ct 值>38 且无标准扩增曲线,判为阴性。

9.5.2 样品 Ct 值≤35,且出现标准的 S 形扩增曲线,判为阳性。

9.5.3 样品 35<Ct 值≤38 且扩增曲线均呈标准的 S 形曲线,判为可疑,需重新检测。如重复后仍然为上述结果,判为阳性,否则判为阴性。

10 综合判定

10.1 临床判定为疑似的易感禽类,按第 6 章分离出新城疫病毒,且鉴定其 ICPI≥0.7,或经第 8 章 RT-PCR 检测呈阳性且经序列分析证明 F 蛋白裂解位点具有强毒特征,或经第 9 章实时荧光 RT-PCR 检测呈阳性的,可判定为新城疫。

10.2 临床无明显特异症状的非免疫动物经第 7 章血凝试验和血凝抑制试验检测出新城疫病毒抗体的,可判定新城疫病毒感染。

10.3 被检禽虽然没有明显的临床症状和病理变化,但病原检测符合 10.1 的病原检测判定标准,可判定为新城疫病毒强毒感染。

附 录 A
(规范性附录)

0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)配制

0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)的配制方法如下:

- a) 氯化钠(NaCl) 8.0 g;
- b) 氯化钾(KCl) 0.2 g;
- c) 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 1.44 g;
- d) 磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.24 g;
- e) 加蒸馏水至 800 mL。

将上述成分依次溶解,用 HCl 调 pH 至 7.2 ± 0.1 ,灭菌双蒸水加至 1 000 mL 定容,121 °C 高压灭菌 15 min。

附 录 B

(规范性附录)

1%鸡红细胞悬液(RBC)制备

B.1 Alserve 液配制

葡萄糖 2.05 g,柠檬酸钠 0.8 g,柠檬酸 0.055 g,NaCl 0.42 g,加蒸馏水至 100 mL,混匀,pH 值调至 6.1,在 121 ℃、15 min 高压灭菌,置 4 ℃备用。

B.2 1% RBC 制备

用 Alserve 液作为抗凝剂,采集至少 3 只 SPF 公鸡或无新城疫抗体的非免疫鸡的抗凝血液,放入离心管中,加入 3 倍~4 倍体积的 PBS 混匀,以 2 000 r/min 离心 5 min~10 min,去掉血浆和白细胞层,重复以上过程,反复洗涤 3 次~4 次,至洗净血浆和白细胞,2 000 r/min 离心 10 min,最后吸取压积红细胞用 PBS 配成体积分数为 1%的悬液,于 4 ℃保存备用。

B.3 注意事项

B.3.1 采集的抗凝血液保存时间不超过 24 h,制备的 1%红细胞悬液最好现配现用。

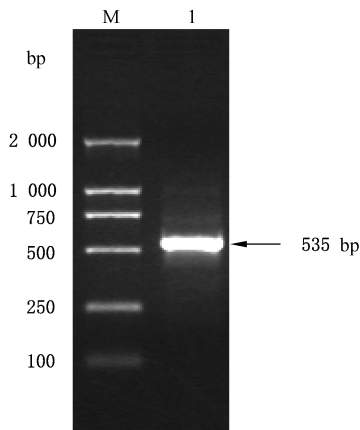
B.3.2 当检测除鸡外的其他禽(如水禽、鸽)血清时,可用与待检血清宿主来源相同的 1%红细胞进行血凝抑制试验,禽 1%RBC 制备方法按 B.2 执行。

B.3.3 有些禽类血清(如水禽、鸽)可能对鸡红细胞产生非特异性凝集,需先用待检血清做血凝试验,如果待检血清出现红细胞凝集现象,则说明有非特异凝集素存在,需用鸡红细胞对待检血清进行吸附,具体方法为:每 0.5 mL 血清中加入 25 μ L 鸡红细胞,轻摇后静置至少 30 min,800 g 离心 2 min~5 min,收集上清液,即为处理后的血清。用处理后的血清进行 HI 试验时,需设处理阳性血清对照。

附 录 C
(资料性附录)

新城疫病毒 RT-PCR 检测阳性参照图

新城疫病毒 RT-PCR 检测阳性参照图见图 C.1。



说明：

M ——DNA 分子量标准(DL2000 Marker)；

1 ——新城疫病毒阳性对照。

图 C.1 新城疫病毒 RT-PCR 检测阳性参照图

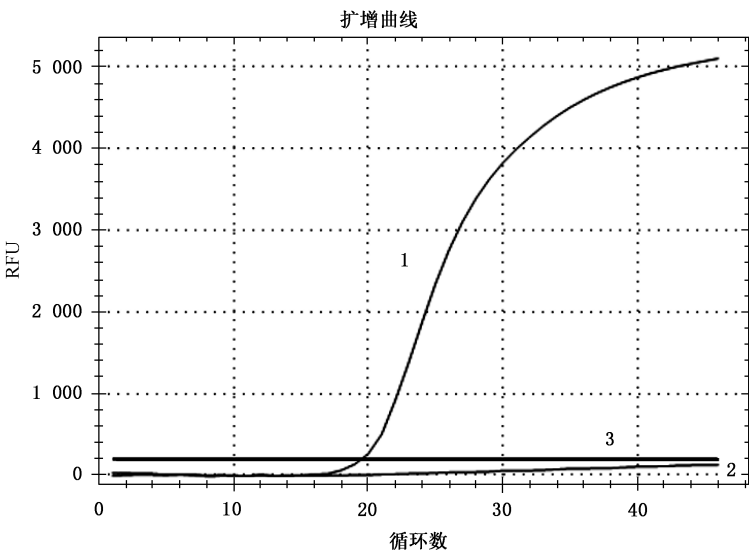


附 录 D

(资料性附录)

新城疫强毒实时荧光 RT-PCR 检测阳性参照图

新城疫强毒实时荧光 RT-PCR 检测阳性参照图见图 D.1。



说明：

1 —— 阳性对照；

2 —— 阴性对照；

3 —— 阈值线；

RFU —— 相对荧光单位 (relative fluorescence units)。

图 D.1 新城疫强毒实时荧光 RT-PCR 检测阳性参照图